

(9) 日本国特許庁 (JP) (11) 特許出願公開
 (12) 公開特許公報 (A) 昭63-126820

(5) Int.Cl.
A 61 K 9/10

識別記号
327

庁内整理番号
6742-4C

(13) 公開 昭和63年(1988)5月30日

審査請求 未請求 発明の数 1 (全5頁)

(4) 発明の名称 外皮用リポソーム製剤

(2) 特願 昭61-273673

(2) 出願 昭61(1986)11月17日

(5) 発明者 鹿子木 宏之 神奈川県横浜市港北区新羽町1050番地 株式会社資生堂研究所内
 (5) 発明者 浅賀 良雄 神奈川県横浜市港北区新羽町1050番地 株式会社資生堂研究所内
 (5) 出願人 株式会社資生堂 東京都中央区銀座7丁目5番5号

明細書

1. 発明の名称

外皮用リポソーム製剤

2. 特許請求の範囲

水難溶性抗菌剤を含有することを特徴とする外皮用リポソーム製剤

3. 発明の詳細な説明

(産業上の利用分野)

本発明は新規な外皮用リポソーム製剤に関する。更に詳しくは、複合脂質を用いて製造されるリポソームに水難溶性の抗菌剤を含有してなる安定性、抗菌効果の優れた外皮用リポソーム製剤に関する。
 (従来の技術)

従来から、白歯菌などの真菌類およびプロピオニバクテリウム アクネス (*Propionibacterium acnes*) に代表される嫌気性ジフテロイドなどの菌類が原因および増悪因子となる、例えば、水虫、タムシ、ニキビ、アクネ、フケなどの様な疾病等があり、これらの疾病等を治療する薬が種々開発されている。その1つとして、種々の抗菌剤が用

いられており、上記原因菌に対して効果を發揮している。

抗菌剤を治療薬として用いるためには、一般的には、軟膏、水溶液、水分散液等の形態にした製剤として用いているが、これらの抗菌剤の中には水難溶性のものが多く、使用性が良く、安定で、薬効が十分發揮される製剤を作るのに多大な苦労を要していた。

(本発明が解決しようとする問題点)

即ち、製剤化した時に配合した薬剤が経時によって結晶として析出する。析出を防ぐために活性剤や油分を共存させて薬剤の溶解性を高めると、皮脂への薬剤の分配が低下し、薬剤活性が十分に発揮できなくなってしまうといった問題点が生じ、抗菌剤を使用性が良く、効果を落とすことなく製剤に安定配合することが当業界の重要な課題であった。

(問題点を解決するための手段及びその作用)

本発明者等は上記問題点を解決すべく鋭意研究を重ねた結果、水難溶性抗菌剤をリポソームに含

有してリポソーム製剤を得ることにより、経時による薬剤結晶の析出がなく、また皮脂への分配が高まり、原因菌に対する優れた抗菌効果を發揮することが分り、この知見に基づいて本発明を完成するに至った。

すなわち、本発明は水難溶性抗菌剤を含有することを特徴とする外皮用リポソーム製剤を提供するものである。

以下、本発明の構成について詳述する。

本発明でいう外皮用リポソーム製剤は、複合脂質を用いて製造されるリポソーム中に水難溶性抗菌剤を含有してなる外皮用リポソーム製剤である。該リポソームとは複合脂質のラメラ層により形式された小胞体であり、水難溶性抗菌剤はリポソームを形成するラメラ相中に含有される。また、これら抗菌剤はラメラ相表面に化学的および物理的に吸着されることもあり、本発明では上記2通りの場合と併せて「含有」と称する。

リポソームの調製法は、常法のいずれかを用いてよく、例えばポルテクスティング法、ソニケー

ション法、プレベシクル法、エタノール注入法、フレンチプレス押出法、コール酸除去法、トリトンX-100バッチ法、 Ca^{2+} 融合法、エーテル注入法、アニーリング法、凍結融解融合法、W/O/Wエマルジョン法、逆相蒸発法等多くの方法があげられるが、これらのいずれの調製法を用いてもよく、これらに限定されるものではない。

本発明のリポソーム製剤の製造に用いられる複合脂質としては、例えは、レシチン、ケファリン、ホスファチジルセリン、スフィンゴミエリン、プラスマローゲン等の天然リン脂質、ジミリストイルレシチン、ジパルミトイールレシチン、ジステアロイルレシチン、ジセチルホスフェート、ステアリルアミン等の合成リン脂質、ジガラクトシルジグレセリド、6-ースルホキノボシリジグリセリド、ガラクトシルセラミド、グルコシルセラミド等の天然糖脂質、グルコシルジバルミトイールグリセロール、セルビオシルジバルミトイールグリセロール、マルトシルジバルミトイール等の合成糖脂質、ステアリルトリメチルアンモニウムクロリドなどの第

4級アンモニウムとセチルアルコールなどのヨー高級アルコールの混合体あるいは天然由来のレシチンの不飽和炭素鎖を水素により飽和とした水添レシチン等が挙げられる。本発明においてはこれらの内から任意の一種又は二種以上が選ばれて用いられる。

リポソームの分散安定性を高めるために複合脂質ラメラ相に荷電を持たせることが望ましい。この場合、負電荷を持たせるときは上記のホスファチジルセリン、ジセチルホスフェートなどの負電荷を持つ脂質を、正電荷を持たせるときは上記のステアリルアミンなどの正電荷を持つ脂質を用いればよい。

本発明のリポソーム製剤の安定化のために、さらにリポソーム中にステロールを配合することができる。かかるステロールとしては、例えはコレステロール、 β -シットステロール、スチグマステロール、カンペステロールまたは植物材料から抽出されるステロールの混合物等が挙げられる。

*本発明で用いる水難溶性抗菌剤の中には、水難

溶性抗真菌剤も含有され、抗菌剤の例としては例えは、バラクロロメタクレゾール、バラクロロメタキシレノール、イソプロビルメチルフェノール、レゾルシン、オルトフェニルフェノール、バラオキシ安息香酸エステル、チモール、ヒノキチオール、ヒドロキシベンゾサチオールなどのフェノール類、安息香酸、サリチル酸、デヒドロ酢酸、ソルビン酸、ホウ酸などの酸類、ヘキサクロロフェン、2',4',4'トリクロロ-2'-ハイドロキシジフェニルエーテル、ピチオノール、ジクロロフェンなどのハロゲン化ビスフェノール類、3,4',4'トリクロロカルバニアリド、3-トリフルオロメチル4,4'ジクロロカルバニアリド、3,4',5-トリブロモサリチルアニリド、ウンデシレン酸モノエタノールアミド、クロルアセタミドなどのアミド類および塩酸クロルヘキシジン、1-ハイドロキシビリジン-2-チオン、イミダゾイルウレア化合物、N-トリクロロメチル、メルカプト-4-シクロヘキセン-1,2ジカルボキシミドなどがあげられる。また、水難溶性抗

真菌剤としては例えば、トルナフテート、イミグゾール、クロトリマゾール、ミコナゾール、ケトコナゾールなどがあげられる。

リポソーム製剤中の水難溶性抗菌剤の配合量は特に限定されないが、一般的には製剤全量中の0.001～20重量%配合することが望ましい。また、概当量の薬剤をリポソームに安定包埋させるためには、薬剤の量が、複合脂質と薬剤混合中の薬剤量として0.002～40重量%を占めるのが好ましいが、薬剤によっては、10重量%以上の配合では、リポソームによる薬剤包埋が困難となり結晶として析出してしまい好ましくない。このため、さらに好ましくは5%以下であることが望ましい。

また、リポソーム製剤安定化のために、必要に応じてさらに配合されるステロールの配合量は、上限50%まで好ましくは0.001～30重量%である。

本発明のリポソーム製剤はリポソームの形態を破壊しない成分であれば、通常の医薬品、化粧品（医薬部外品を含む）等に配合される一般的な成

分を配合できる。

（発明の効果）

本発明のリポソーム製剤は、経時で安定であり、これを皮膚表面に塗布することにより、リポソーム自体は経皮吸収されることはないと、薬剤の皮脂への分配を高め局所における薬剤濃度の増大をもたらし充分な効果が発揮される。

本発明により、より少ない薬剤量で従来と同様の効果が期待できる。また、リポソーム製剤自身の安全性も高い。

（実施例）

次に本発明の一層の理解のために、実施例をあげて更に詳細に説明するが本発明をこれらの実施例によって限定するものではないことはいうまでもない。

実施例1

50m1ナス型フラスコ中でジバルミトイレシチン0.63g、コレステロール0.32g、ジセチルホスフェート50mgおよび3, 4, 4'トリクロロカルバニアリド10mgをクロロホルム10m1に溶解した後、

ロータリーエバボレーターを用いてクロロホルムを留去し、フラスコ底壁に複合脂質膜を得た。これを真空デシケータ中で2時間乾燥しクロロホルムを完全に留去した。これにリン酸緩衝液（PH 7.4）10m1を加え、50℃で30分水和させた後、ボルテックスミキサーにより激しく振とうすることによりフラスコ底壁に形成した上記複合脂質膜を完全に分散せしめて粒径0.1～数μmのリポソームを形成させ、リポソーム分散液とした。

実施例2

50m1ナス型フラスコ中で卵黄レシチン1.0g、ジセチルホスフェート50mgおよび2, 4, 4'トリクロロ2'-ハイドロキシジフェニルエーテル10mgをジエチルエーテル6m1に溶解した後、リン酸緩衝液2m1を加え、これに超音波を照射することによりW/Oエマルジョンを得た。これをロータリーエバボレーターを用いてジエチルエーテルを留去してゲル化させ、軽く振とうした後、残ったジエチルエーテルを留去して、濃厚な粒径0.1～1.0μmのリポソーム分散液を得た。本分散液は、こ

れを適度に希釈することができる。

実施例3

実施例1に準じて、後述表1に示す各濃度の3, 4, 4'トリクロロカルバニアリドを含有するリポソーム製剤を得た。また、リン脂質としてジバルミトイレシチンに替えて、水添レシチンを含有したリポソーム製剤を得た。

比較例1

実施例3と同濃度の3, 4, 4'トリクロロカルバニアリドのエタノール溶液を得た。

実施例3で得たリポソーム製剤と、比較例1のエタノール溶液との抗菌効果をペーパーディスク法により評価した。

即ち、あらかじめスタフィロコッカス オウレウス (*Staphylococcus aureus*) FDA209P 株を10⁵/m1程度均一に分散させた肉汁寒天培地に皮膚表面をモデル化するために皮膚表面の皮脂量に相当する皮脂類似油分のエマルジョンを混入させた培地を重層固化させる。リポソーム製剤およびエタノール溶液 100μLをしみこませた直径8mmのト

一ヨーろ紙を、上記培地の上部に接触させ、30℃ 24時間培養する。抗菌剤が有効に作用している範囲は菌の増殖が阻止される。この阻止帯の直径から抗菌効果を評価した。

表1

3.4.4'トリク ロロカルボアニ リド (%)	0	0.0025	0.005	0.01	0.02
実施例3	ジバルミト イルレシチ ン	N.D.	8.0	8.5	9.5
	水添レシチン	N.D.	9.0	9.0	11.0
比較例1		N.D.	N.D.	8.0	8.5

(N.D.: 阻止帯検出されず) (単位mm)
表1から明らかなように、本発明によるリポソーム製剤は、エタノール溶液による薬剤単独塗布より強い抗菌作用を示し優れた剤型であることが分る。

実施例4

50mlナス型フラスコ中で水添レシチン2.8g、コ
レステロール1.2gおよび3, 4, 4'トリクロロ

カルバアニリド40mgをクロロホルム20mlに溶解した後ロータリーエバボレーターを用いてクロロホルムを留去し、フラスコ底壁に複合脂質膜を得た。これを真空デシケータ中で2時間乾燥しクロロホルムを完全に留去した。これに、イオン交換水13.96gを加え、60℃に加熱しホモミキサーにより複合脂質膜を完全に分散せしめてリポソームを形式させた。この分散液にさらに1,3-ブチレングリコール2gを加えた後1%ヒアルロン酸水溶液で後述表2に示す各濃度に希釈してリポソーム分散ゲル製剤を得た。

上記溶液にスタフィロコッカス オウレウス (*Staphylococcus aureus*) FDA209P 株を 10^5 / ml接種しその殺菌力を溶液1ml中の菌数変化から評価した。

(以下余白)

表2

	実施例 4	リポソーム (-)					
3, 4, 4' トリクロロカ ルバアニリド (%)	0	0.01	0.05	0.1	0.01	0.05	0.1
時間							
0 hrs	7.6×10^5	5.3×10^5	3.9×10^5	2.2×10^5	7.5×10^5	4.2×10^5	3.4×10^5
1.5	6.3×10^5	4.6×10^5	2.1×10^2	<10 ²	5.4×10^5	5.1×10^4	4.6×10^4
5	7.1×10^5	3.3×10^3	<10	<10	4.1×10^4	7.2×10^3	<10 ²
24	4.9×10^4	<10	<10	<10	<10 ²	<10 ²	<10

(単位 cells / ml)

表2から明らかなように、本発明によるリポソーム製剤は、ゲル製剤にして薬剤0.01%という低濃度で十分に殺菌能を有することが分る。

実施例5

50mlナス型フラスコ中でジバルミトイールレシチン2.8g、コレステロール1.2gおよびトルナフテート0.4gをクロロホルム20mlに溶解した後、ロータリーエバボレーターを用いてクロロホルムを留去し、フラスコ底壁に複合脂質膜を得た。

これを真空デシケータ中で2時間乾燥しクロロホルムを完全に留去した。これにイオン交換水10.6gを加え、60℃に加熱しプローブタイプの超音波乳化機により複合脂質を完全に分散せしめて粒径300Åの微小なリポソームを形成させた。この分散液にさらに1%ハイビスケル溶液5gを加えて、リポソーム分散ゲル製剤を得た。

実施例6

50mlナス型フラスコ中でジバルミトイールレシチン6.9g、ガラクトシルセラミド1.0g、ジセチルホスフェート0.1gおよびヒノキチオール3.0gをクロ

ロホルム10mlに溶解した後、ロータリーエバボレーターを用いてクロロホルムを留去し、フラスコ底壁に複合脂質膜を得た。これを真空デシケータ中で2時間乾燥しクロロホルムを完全に留去した。これにリン酸緩衝液(PH7.4)10mlを加え、70℃で20分水和させた後、ポルテックスミキサーにより激しく振とうすることによりフラスコ底壁に形成した上記複合脂質膜を完全に分散せしめて粒径0.1~数μmのリポソームを形成させ、リポソーム分散液とした。

実施例7

大豆レシチン2.0g、グルコシルジバルミトイールグリセロール0.5g及びクロトリマゾール0.001gをエタノール5gに溶解して後、イオン交換水70g中に激しく攪拌しながら滴下し、粒径約0.1μmのリポソーム分散液を得た。

特許出願人 株式会社 資生堂

手続補正書

昭和62年2月23日

特許庁長官 黒田明雄

1. 事件の表示

昭和61年特許願第273673号

2. 発明の名称

外皮用リポソーム製剤

3. 補正をする者

事件との関係 特許出願人

住 所 東京都中央区銀座7丁目5番5号

名 称 (195) 株式会社 資生堂

代表者 野良雄

4. 補正命令の日付

自発

5. 補正により増加する発明の数

0 発明

6. 補正の対象

明細書の発明の詳細な説明の欄

7. 補正の内容

(1) 明細書第3頁第19行目に「常法のいすれかを」とあるを「常法のいすれを」と補正する。

(2) 明細書第4頁第14~15行目に「ジガラクトシルジグレセリド」とあるを「ジガラクトシルジグリセリド」と補正する。

(3) 明細書第4頁第19行目に「マルトシルジバルミトイール」とあるを「マルトシルジバルミトイグルグリセロール」と補正する。

(4) 明細書第9頁第16行目に「エマルジョン」とあるを「エマルジョン」と補正する。

(5) 明細書第14頁第14行目に「300A」とあるを「300Å」と補正する。



⑪ 公開特許公報 (A) 平2-204413

⑤Int.Cl.⁵A 61 K 31/415
9/127

識別記号

ADZ

庁内整理番号

T 7475-4C
7624-4C

④公開 平成2年(1990)8月14日

審査請求 未請求 請求項の数 1 (全5頁)

⑥発明の名称 抗真菌外用製剤

⑦特 願 平1-24640

⑧出 願 平1(1989)2月2日

⑨発明者 河野 賢治 愛知県名古屋市西区鳥見町2丁目130番地 日本メナード化粧品株式会社中央研究所内

⑩発明者 中田 悟 愛知県名古屋市西区鳥見町2丁目130番地 日本メナード化粧品株式会社中央研究所内

⑪出願人 有限会社野々川商事 愛知県名古屋市中区丸の内3丁目5番24号

明細書

1. 発明の名称

抗真菌外用製剤

2. 特許請求の範囲

抗真菌剤を内包したリポソームを主剤成分として配合したことを特徴とする抗真菌外用製剤

3. 発明の詳細な説明

〔産業上の利用分野〕

本発明は、抗真菌外用製剤に関する。さらに詳しくは、抗真菌剤をリポソーム化し主剤成分として含有することにより、安全性が優れ、皮膚局所投与の際、その経皮吸収を高め、皮膚の表皮、真皮に薬物が貯留する抗真菌外用製剤に関するものである。

〔従来の技術〕

抗真菌外用製剤としては、ウンデシレン酸、サリチル酸、ヨウ素、トルナフタート、クロトリマゾール、シッカニンなどを含有する、クリーム剤液剤などが知られている。

〔発明が解決しようとする問題点〕

抗真菌外用製剤を経皮投与する場合、皮膚角質層のバリアー機能のため薬物の吸収量が少なく充分な薬効は期待できない。実際には、皮膚糸状菌の寄生部位が皮膚角質層に留まる、表在性白癖のみに有効であり、皮膚真皮以下にまで侵入する深在性白癖には全く無効である。そのため、一度皮膚表面は治療したかのように思われるが、皮膚のターンオーバーとともに再発し治療しにくいという問題があり、有効な手段は見つかっていない。

〔問題を解決するための手段〕

この様な事情に鑑み、本発明者らは、銳意研究を重ねた結果、抗真菌剤をリポソーム化して主剤成分として配合することにより、皮膚透過性が良く、薬物が角質層だけでなく、表皮、真皮にまで達し、表在性真菌症だけでなく、深在性真菌症にも優れた治療効果を發揮することを認め本発明を完成するに至った。

すなわち、本発明は、抗真菌剤を内包したリポソームを主剤成分として配合した抗真菌外用製剤に関するものである。

本発明で使用される抗真菌剤とは、イミダゾール誘導体、抗生物質などが挙げられる。イミダゾール誘導体としてはクロトリマゾール、ミコナゾール、エコナゾール、ケトコナゾールなどがある。イミダゾール誘導体は、真菌の細胞膜に対する直接の阻害と、エルゴステロールの合成阻害による作用を持ち、その抗菌スペクトルは、殆ど全ての真菌とブドウ球菌など一部の細菌にも及び、抗菌活性も強く、広く使われている。また、抗生物質としてはシッカニン、ピロールニトリリンが挙げられ、その他にもトルナフタート、トリシクレート、シクロピロクスオラミン、サリチル酸、ヨウ素、エキサラミド、ウンデシレン酸などが挙げられる。本発明のリボソームは、抗真菌剤を溶媒に溶解したもの、リン脂質及び水の3成分に超音波をかけて得られる。このリボソームはリン脂質の二分子膜の一重層あるいは多重層から成る球状の小胞体で、抗真菌剤がリン脂質の膜中または小胞体内に取り込まれた状態（内胞）となる。

抗真菌剤を溶解する溶媒にはアルコールや多価

アルコールなどが挙げられる。アルコールとしては、エタノール、プロパノール、イソプロパノールなどであり、多価アルコールとしてはポリエチレンギリコール300、ポリエチレンギリコール400、ポリエチレンギリコール600、グリセリン、1,3-ブチレンギリコール、プロピレンギリコールなどが挙げられる。その他にもミリスチン酸イソプロピル、クロタミトン、アセトン、メチルエチルケトンなどが挙げられる。

また、リボソーム化にはこれ以外にVortexミキサー法、薄膜法、界面活性剤除去法、注入法、フレンチプレス法、逆相蒸発法などがあり、抗真菌剤の性質に合わせて適宜選択して、リボソームを調製して配合すれば良い。さらにリボソームの安定化の目的でコレステロール、グルコース、アミノ酸、高級アルコール、非イオン界面活性剤、イオン性界面活性剤などを添加することができる。リボソーム化に用いられるリン脂質は、大豆リン脂質、卵黄リン脂質、水素添加大豆リン脂質、水素添加卵黄リン脂質、合成リン脂質などであり、

1種または2種以上混合して用いることができる。

本発明においてリボソームに内包される抗真菌剤は、薬理活性を考えて0.01～10重量%の割合になるように添加される。好ましくは、0.1～5重量%の割合になるように添加される。リボソーム化に用いられるリシン脂質は抗真菌剤に対して0.1～10倍量の濃度になるように配合する。抗真菌剤の濃度は0.01重量%以下の配合量では、効果は期待できず、10重量%以上の配合量では、リボソーム化が困難である。また、リン脂質は抗真菌剤に対して0.1倍量以下の濃度では、抗真菌剤を全てリボソーム化することはできず、10倍量以上では、リン脂質が多くてリボソーム化が困難である。

抗真菌剤のマウスに対するLD₅₀は、いずれも1000mg/kg以上であった。

(実施例)

次に実施例により本発明を更に説明するが、本発明はこれにより限定されるものではない。処方中の数字は重量%を示す。

実施例-1 クリーム

①スクワラン	9.0
②ステアリルアルコール	0.5
③セチルアルコール	0.5
④ポリオキシエチレン(20)ソルビタンモノステアレート	1.5
⑤ソルビタンモノオレエート	2.3
⑥ミリスチン酸オクチルドデシル	8.5
⑦ワセリン	4.0
⑧精製水	33.8
⑨クロタミトン	5.0
⑩ポリエチレンギリコール400	5.0
⑪トルナフタート	3.0
⑫水素添加大豆リン脂質	9.0
⑬精製水	17.9
合計	100.0

成分⑪トルナフタートを、成分⑫⑬に溶解したものを、成分⑪⑬に加え、超音波攪拌してリボソームを調製する。

成分①～⑦を80℃に加熱溶解後、予め80℃

に加熱溶解した成分④を加え乳化し、30℃迄冷却する。これに成分⑨～⑪で調製したリポソームを添加し、攪拌混合するとクリームが得られる。

実施例-2 液剤

①エタノール	5. 0
②精製水	53. 5
③エタノール	10. 0
④クロトリマゾール	1. 0
⑤水素添加大豆リン脂質	7. 0
⑥精製水	23. 5
合計	100. 0

成分③に成分④クロトリマゾールを溶解したものを、成分⑤に成分⑥を70℃加熱溶解した中に加え、超音波攪拌してリポソームを調製する。次いで、成分①②を加えて得られる。

実施例-3 液剤

①エタノール	10. 0
②グリセリン	4. 0
③1, 3-ブチレングリコール	3. 0
④精製水	40. 9

⑤水素添加卵黄リン脂質	3. 5
⑥コレステロール	0. 1
⑦シッカニン	0. 5
⑧イソプロピルアルコール	14. 0
⑨精製水	24. 0
合計	100. 0

成分⑤⑦をエーテルに溶解させたものをナス型フラスコにいれ、エバボレーターによりエーテルを留去する。これに成分⑨を加え60℃で攪拌する。次に成分⑧⑨を溶解し、30℃まで冷却してリポソームを調製した。成分①～③を攪拌溶解後、成分④及び成分⑤～⑨で調製したリポソームを加え、攪拌混合して液剤を得る。

実施例-4 クリーム

①スクワラン	7. 0
②ミリスチン酸オクチルドデシル	5. 0
③サラシミツロウ	3. 0
④流動バラフィン	2. 0
⑤グリセリン	2. 0
⑥ソルビタンモノオレエート	2. 5

⑦ポリオキシエチレン(15)セチル	
エーテル	1. 5
⑧精製水	45. 0
⑨水素添加卵黄レシチン	6. 0
⑩ポリオキシエチレン(60)硬化	
ヒマシ油	0. 5
⑪ミコナゾール	2. 0
⑫精製水	23. 5
合計	100. 0

成分⑪ミコナゾール、⑨⑩を成分⑫に溶解し、超音波をかけてリポソームを調製する。

成分①～⑦を80℃に加熱溶解後、予め85℃に加熱溶解した成分⑩を加え乳化し、30℃迄冷却する。これに成分⑨～⑫で調製したリポソームを添加し、攪拌混合するとクリームが得られる。

[発明の効果]

本発明の効果は、抗真菌剤をリポソーム化し主剤として配合することにより、皮膚の局所治療の際、主剤の経皮吸収を高め、皮膚の表皮、真皮に貯留し、優れた薬効を示す抗真菌外用製剤である。

次に、本発明の効果について動物実験、濃度分布試験、臨床試験及び培養試験の結果を示す。

(動物実験)

実施例-1のクリーム及び下記の比較例-1のクリームについて各20匹ずつ2日前に毛を刈り取ったモルモット背部10×10cm²に、皮膚糸状菌であるTrichophyton Rubrumの懸濁液0.5mlを緩和に塗擦し感染させた。この懸濁液は、感染24時間前に吸光度0.4を示す真菌懸濁液と、Nervina nutrient brothを2:1の割合で混合させて調製し、28℃でインキュベートしたものである。治療は感染後第3日目から1日1回7日間、実施例-1及び比較例-1のクリームを1g感染部位に投与し、感染部の状態の変化について目視にて観察した。その結果を表1に示す。

比較例-1 クリーム

実施例-1のクリームより、成分⑪をリポソーム化せずそのまま配合して実施例-1と同様にクリームを調製した。

表 1 の結果より、抗真菌剤トルナフタートをリポソーム化して配合したクリームは、皮膚糸状菌である *Trichophyton Rubrum*に対し良好な治癒効果を示し、抗真菌外用製剤として有効なことが分かる。また、実施例 - 2、3、4においても同様な結果を得た。

表 1 動物実験結果

	実施例 - 1	比較例 - 1
匹 数	20	20
著 効	15	10
有 効	4	6
やや有効	1	2
無 効	0	2
有効率	19/20=95%	16/20=80%

(濃度分布試験)

実施例 - 2 及び下記の比較例 - 2 の液剤について ^{14}C で標識したクロトリマゾールを用い、皮膚透過性、濃度分布及び経皮吸収について、毛刈り取ったラットの背部 $5 \times 10 \text{ cm}^2$ に、0.5 ml を塗布し、12時間作用させた後の濃度分布をオートラジオグラフィーにて測定した結果を表 2 に示す。

比較例 - 2

実施例 - 2 より成分③に、成分④⑤を溶解させリポソーム化せず、成分①②⑥にそのまま配合して実施例 - 2 と同様に調製した。

表 2 の結果より、抗真菌剤クロトリマゾールをリポソーム化し配合した液剤は、経皮吸収性に優れ、皮膚の表皮、真皮にまで達し、表在性真菌症だけでなく深在性真菌症にも有効なことが分かる。また、実施例 - 1、3、4 も同様に良好な結果を得た。

以下余白

表 2 組織内濃度分布

部 位	実施例 - 2		比較例 - 2	
	濃度 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$	濃度 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$	濃度 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$	濃度 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$
表皮	角質層	70 ~ 120	30 ~ 80	
	有 層	30 ~ 60	3 ~ 6	
真皮	乳頭層	40 ~ 60	1 ~ 2	
	網状層	20 ~ 30	0.1 ~ 0.5	
皮下組織		< 10		< 0.1

週間を一応の基準とした。副作用については、接触皮膚炎はもちろんのこと、塗布時の刺激感、発赤、搔痒感などについても記載した。その結果を表 3、4 に示す。

比較例 - 3

実施例 - 3 の液剤より成分⑦をリポソーム化せず、そのまま配合して実施例 - 3 と同様に液剤を調製した。

表 3、4 の結果より抗真菌剤シッカニンをリポソーム化し配合することにより、足白癖に対して優れた治癒効果を示し、副作用も少ないことが分かる。また、実施例 - 1、2、4 についても同様に良好な結果を示した。

以下余白

(臨床試験)

臨床試験に当たっては、ボランティアを募り、この中で白癖症にかかっており、何れも検鏡で菌陽性の人 48 名を対象とし、足白癖に限定した実施例 - 3 及び下記の比較例 - 3 の液剤について、1日2回適量を感染部位に投与し、観察期間は 2

表 3 効果判定

	実施例 - 3	比較例 - 3
症 例	25	23
著 効	14	6
有 効	7	8
やや有効	4	6
無 効	0	3
有効率	21/25=84%	14/23=61%

以下余白

表 4 副作用

	実施例 - 3	比較例 - 3
症 例	25	23
副作用例数	1	6
副 作 用 の 種 類	刺激感	0
	発赤	1
	搔痒感	0
	皮膚炎	1

(培養試験)

実施例 - 4 のクリーム及び下記の比較例 - 4 の
クリームについて各 10 羽ずつ 1 日前に毛を刈り

取ったウサギ背部 $10 \times 20 \text{ cm}^2$ に、カンジタ菌である *Candida albicans* を 1 ml 当り $1 \sim 3 \times 10^3$ 個含む溶液 2 ml を塗布し感染させた。治療は感染後第 2 日目から 1 日 2 回 10 日間、実施例 - 4 及び比較例 - 4 のクリーム 2 g を感染部位に投与した。その後、皮膚を剥離し表皮組織及び真皮組織の一部を培養し菌の検出を試みた。培養成績は、3 日、5 日、7 日、14 日、及び 28 日目（培養日数）にそれぞれ判定した。

Candida albicans の菌を認めた匹数を表 5 に示した。

比較例 - 4 クリーム

実施例 - 4 のクリームより成分①をリポソーム化せず配合して、実施例 - 4 と同様にクリームを調製した。

表 5 の結果より、抗真菌剤ミコナゾールをリポソーム化して配合することにより、皮膚中のカンジタ菌の検出も少なく、良好な治療効果を示すことが分かる。また、実施例 - 1, 2, 3 においても同様な結果を得た。

表 5 培養試験結果

	実施例 - 4		比較例 - 4	
	表 皮	真 皮	表 皮	真 皮
3 日目	0	0	0	0
5 日目	0	0	2	2
7 日目	0	1	2	3
14 日目	1	1	3	3
28 日目	1	2	4	4

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- BLACK BORDERS**
- IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- FADED TEXT OR DRAWING**
- BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- SKEWED/SLANTED IMAGES**
- COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- GRAY SCALE DOCUMENTS**
- LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.